

Rezeptor der ED_b-Fibronektin-Domäne

Die Erfindung betrifft ein Protein, das spezifisch an die ED_b-Fibronektin-Domäne bindet.

Fibronektine sind eine wichtige Klasse von Matrix-Glykoproteinen. Ihre Hauptrolle besteht darin, das Anhaften von Zellen an eine Vielzahl verschiedener extrazellulärer Matrices zu ermöglichen. Das Vorhandensein von Fibronektinen auf der Oberfläche von nicht-transformierten Zellen in Kultur sowie deren Abwesenheit bei transformierten Zellen führte zur Identifizierung von Fibronektinen als wichtigen Adhäsionsproteinen. Sie wechselwirken mit zahlreichen verschiedenen anderen Molekülen, z. B. Collagen, Heparansulfat-Proteoglykanen und Fibrin, und regulieren damit die Zellform und den Aufbau des Zytoskeletts. Weiterhin sind sie verantwortlich für Zellmigration und Zelldifferenzierung während der Embryogenese. Sie sind außerdem wichtig für die Wundheilung, bei der sie die Wanderung von Makrophagen und anderen Immunzellen in das betroffene Gebiet ermöglichen, und bei der Bildung von Blutgerinnseln, indem sie das Anheften von Blutplättchen an beschädigte Regionen der Blutgefäße ermöglichen.

Fibronektine sind Dimere zweier ähnlicher Peptide, wobei jede Kette ungefähr 60 - 70 nm lang ist. Wenigstens 20 verschiedene Fibronektin-Ketten sind identifiziert worden, von denen alle durch alternatives Spleißen des RNA-Transkripts eines einzelnen Fibronektin-Gens erzeugt werden. Eine Analyse von proteolytischen Verdauen von Fibronektin zeigt, daß die Polypeptide aus sechs stark gefalteten Domänen bestehen, von denen jede Domäne wiederum sog. Wiederholungssequenzen („repeats“) enthält, deren Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz eine Klassifikation in drei Typen erlauben (Typ I, II, III). Die zentrale Region beider Ketten aus dem Dimer besteht aus einem Abschnitt von sog. Typ-III-Wiederholungen, die durchschnittlich 90 Aminosäuren lang sind (Kornbliht AR, Vibe-Pedersen K und Baralle FE, 1983. Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 3218-22). Strukturelle Studien haben ergeben, daß jede Typ-III-Wiederholung aus sieben beta-Strängen besteht, die in zwei antiparallele Falblätter gefaltet sind, wobei kur-

ze Loop-Regionen als potentielle Protein-Protein-Wechselwirkungsstellen exponiert sind (Leahy DJ, Hendrickson WA, Aukhil I und Erickson HP. 1992. Structure of fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science*, 258, 987-91). Diese Wiederholungen vom Typ III ermöglichen es, daß Fibronektine als Adhäsionsmoleküle fungieren, die mit Zelloberflächenmolekülen, den so „Integrinen“ interagieren. Der Begriff des Integrins wurde 1987 erstmals in einem Übersichtsartikel (Hynes R.O., 1987, *Cell* 48, 549-550) verwendet, um eine verwandte Gruppe von heterodimeren Zelloberflächenmolekülen zu beschreiben, die als Vermittler zwischen der extrazellulären Matrix und dem intrazellulären Cytoskelett fungieren und so die Zelladhäsion und Migration induzieren. Diese heterodimeren Rezeptoren „integrieren“, oder vermitteln also Signale vom extrazellulären Milieu mit spezifischen zellulären Funktionen. Bis heute sind 17 beta-Untereinheiten bekannt, die mit mehr als 20 alpha-Untereinheiten spezifisch und nicht-kovalent interagieren können, um so mehr als 20 verschiedene Familien zu bilden (Plow E. F. et al. 2000, *J Biol Chem*, 275, 21785-21788). Insbesondere vermittelt die Sequenz RGDS, die sich in der zehnten Wiederholung vom Typ III des Fibronektins befindet (III-10), die Wechselwirkung von Fibronektin mit wenigstens 8 verschiedenen Integrinen. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß mindestens vier Integrine in einer RGDS-unabhängigen Weise spezifisch mit Fibronektin interagieren können (Plow E. F. et al. 2000, *J Biol Chem*, 275, 21785-21788). Die Gruppe der Wiederholungssequenzen vom Typ III umfaßt neben den III7-, III8-, III9- und III10-Sequenzen auch die Repeats EIIIB und EIIIA (ED_b und ED_a). Die Funktionen dieser beiden Wiederholungssequenzen sind bislang nicht oder nur zu einem geringen Maße verstanden. Eine Studie von Jarnagin W. et al. (Jarnagin W. Rockey D. Koteliensky V. Wang S. und Bissell D. 1994, Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol*, 127, 2037-48) legt nahe, daß die ED_a-Domäne bei einer frühen Antwort der Leber auf eine Verletzung beteiligt ist, und weiterhin scheint die ED_a-Domäne beim Vermitteln von Zelladhäsionsvorgängen beteiligt zu sein. Eine Fibronektin-Isoform, die die ED_b-Sequenz (ED_b-FN oder ED-B oder EDB) enthält, ist in normalem Erwachsenenewebe nicht nachweisbar, zeigt jedoch eine starke Expression in fötalem Gewebe sowie Tumorgewebe, ebenso wie auch während der Wundheilung.

Während der Entwicklung eines Tumors wird die extrazelluläre Matrix des Gewebes, in dem der Tumor wächst, durch proteolytischen Abbau bereits existierender Matrix-Bestandteile umgebaut. Hierbei entsteht eine tumorinduzierte extrazelluläre Matrix, die sich von der von normalen Geweben unterscheidet, eine geeignetere Umgebung für das Tumorwachstum bietet und die Angiogenese fördert. Angiogenese ist einer der wichtigsten Vorgänge beim Tumorwachstum und bezeichnet den Prozeß, bei dem neue Gefäße aus existierenden Endothel-beschichteten Gefäßen hervorgehen. Angiogenese ist ein invasiver Prozeß, der eine Proteolyse der extrazellulären Matrix, Proliferation, gerichtete Wanderung und Differenzierung von Endothelzellen in neue Kapillaren erfordert, die das Wachstum eines Tumors über eine bestimmte Größe hinaus unterstützen.

ED_b-Fibronektin ist mit dem Tumorwachstum in Verbindung gebracht worden. Weiterhin ist ED_b-FN um neue Blutgefäße während angiogener Vorgänge angereichert und stellt somit einen Marker für die Angiogenese bereit (Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L (1994) Int. J. Cancer 59:612-618).

Die ED_b-Domäne ist eine Wiederholungssequenz vom Typ III, umfassend 91 Aminosäuren, und weist eine extrem hohe Sequenzhomologie zwischen dem Ratten- und Hühner-Fibronektin auf, die zwischen 96 % und 100 % liegt. Innerhalb der Domäne kommen keine RGDS- oder andere Aminosäuresequenzen vor, von denen bekannt ist, daß sie eine Interaktion mit Integrinen vermitteln. Die genaue Funktion der ED-B -Domäne ist bis dato unbekannt. Drei Studien sind veröffentlicht worden, die Spekulationen über eine allgemeine fördernde Funktion hinsichtlich Adhäsion/Zellausbreitung für verschiedene Zellen anstellen.

Chen und Culp (1996), Exp. Cells Res. 223, 9-19, haben gezeigt, daß zelluläre Fibronektine die ED_b-Domäne und benachbarte Wiederholungssequenzen vom Typ III als u. U. adhäsionsfördernde Sequenzen enthalten, die von den Zellen durch alternatives Spleißen des primären Transkripts von Fibronektin reguliert werden können.

In einer späteren Studie (Chen und Culp, 1998, Clin. Exp. Metast., 16, 1, 30-42) konnte gezeigt werden, daß ED_b Zell-Signal-Ereignisse induziert, die zu einer Ty-

rosin-Phosphorylierung von fokalen Adhäsionsproteinen führt, und zwar mit einem Mechanismus, der sich von demjenigen unterscheidet, der durch die Wiederholungssequenzen III8-9-10 vermittelt wird, welche Integrine erkennen. Es wird zunehmend anerkannt, daß die Zelladhäsion an extrazelluläre Matrices bzw. an andere Zellen eine wichtige Quelle für Zell-Signale ist, die für die Regulation vieler Phänomene verantwortlich ist, wie z. B. Zellwachstum, -differenzierung und -transformation. Ein Adhäsions-induziertes Signalgeben beinhaltet die Aktivierung von Protein-Tyrosin-Kinasen und eine Kaskade der Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener Signal-Moleküle. Die Autoren der eben genannten Studie weisen darauf hin, daß für diesen Signalprozeß die 125 kDa fokale Adhäsionskinase (FAK) von zentraler Bedeutung ist, die die Zell-Wechselwirkung mit Matrix-Proteinen an die Aktivierung von intrazellulären Signalmolekülen verknüpft, wie etwa Src (Xing Z, Chen HC, Nowlen JK, Taylor SJ, Shalloway D und Guan JL, 1994, Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. *Mol Biol Cell*, **5**, 413-21), Grb2 (Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T und van der Geer P, 1994, Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, **372**, 786-91) und PI-3-Kinase (Chen HC und Guan JL, 1994, Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 10148-52). Von einem anderen fokalen Adhäsionsprotein p130cas wird ebenso angenommen, daß es bei Adhäsions-vermittelten Signalereignissen und bei spezifischen Onkogen-Aktivitäten beteiligt ist, obwohl seine genaue Funktion bisher nicht aufgeklärt ist (Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, *et al.* 1994, A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes *in vivo* with v-Crk and c-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J*, **13**, 3748-56; Petch LA, Bockholt SM, Bouton A, Parsons JT und Burridge K, 1995, Adhesion-induced tyrosine phosphorylation of the p130 SRC substrate. *J Cell Sci*, **108**, 1371-9; Polte TR und Hanks SK, 1995, Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130^{Cas}. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 10678-82).

Die Studie von Chen und Culp (1998, aaO) zeigt, daß das Mono-Wiederholungs-Protein ED₆ stärker fördernd war für die Ausbreitung von Balb/c 3T3-Zellen sowie für das Induzieren von FAK-Tyrosin-Phosphorylierung als die benachbarten Repeats III8 etc.. Es wird die Vermutung angestellt, daß bei physiologischen Kon-

zentrationen der zellulären Fibronektine die Bindung des Tetrapeptids RGDS aus III10 an die Integrine möglicherweise ein nicht hinreichend starkes Signal für die Zelladhäsion erzeugt, so daß es bei dem durch die Wechselwirkung zwischen III10 und Integrin-vermittelten Mechanismen zu keiner Tyrosin-Phosphorylierungs-

5 Antwort kommt. Es wird weiter vermutet, daß der Unterschied hinsichtlich der Antwort auf die unterschiedlichen vermittelten Zelladhäsionen durch eine unterschiedliche Aktivierung verschiedener kleiner GTP-bindender Proteine verursacht wird. Drei dieser Proteine, cdc42, rac und rho, die alle Mitglieder der ras-Superfamilie sind, spielen wichtige Rollen bei zell-morphologischen Veränderungen. cdc42 agiert sequenziell stromaufwärts von rac und induziert direkt das Er-
10 scheinen von Filopodien (Nobes CD und Hall A, 1995, Rho, rac, und cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia, *Cell*. 81, 53-62). Die Aktivierung von rac ist dann verantwortlich für die Bildung von Lamellipodien und das Netzwerk von Aktin-Filamenten zwischen den Filopodien. Weiter stromabwärts rho kann durch rac aktiviert werden und induziert fokale Adhäsionen und Aktin-Zugfasern. Alle diese Ereignisse sind abhängig von der Aktivierung von Tyrosin-Kinase, und von FAK wird angenommen, daß sie bei diesen Vorgängen beteiligt ist. Chen und Culp
15 stellen die Vermutung an, daß die morphologischen Unterschiede zwischen Zellen, die über 7-ED_b-8 adhären sind, sowie Zellen, die über 8-9-10 adhären sind, auf der unterschiedlichen Aktivierung der kleinen GTP-bindenden Proteine beruht. Daraus wird gefolgert, daß eine Adhäsion über 8-9-10 über den Integrin-vermittelten Signalweg schließlich zu einer Aktivierung von rho führt, um fokale Adhäsionen und Aktin-Zugfasern zu erzeugen, während die Adhäsion von Balb/c-
20 3T3-Zellen über 7-ED_b-8 nur zu einer Aktivierung von cdc42- und rac-Proteinen führt, nicht jedoch rho aktiviert. Für die eben genannten Mutmaßungen werden jedoch in keiner der beiden Studien Daten präsentiert.

Eine andere Studie (Hashimoto-Uoshima et al., 1997, *J. Cell Sci.* 110, 2271-2280) zeigt, daß die Zell-Adhäsion von kultivierten Fibroblasten durch die Anwesenheit
30 von Fibronektin-Fragmenten, die die ED_b-Fibronektin-Domäne einschließen, verstärkt wird. Daraus wird gefolgert, daß die gespleißte ED_b-Domäne eine wichtige biologische Funktion hinsichtlich der Verstärkung der Zell-Adhäsion und -ausbreitung haben kann. Demgegenüber verhindert der Einschluß von ED_a in

Fragmenten in Abwesenheit von ED_b die Ausbildung von guten fokalen Adhäsionen in Zellen. Darauf basierend, spekulieren die Autoren dieser Studie, daß der Einschluß beider Domänen im Fibronektin-Molekül einen Mechanismus darstellen kann, mit dem eine Zell-Adhäsion in dem Ausmaße erreicht wird, daß Fortbewegungsvorgänge erleichtert werden, bei denen sowohl Adhäsion als auch Verluste der Adhäsion für das Fortbewegen von Zellen benötigt wird.

Untersuchungen an Hühnerembryonen und erwachsenen Mäusen zeigten, daß ED_b-vermittelte Angiogenese durch Inhibition des Endothelzell-Integrins $\alpha 3 \beta 1$ blockiert werden kann (Renato et al., AACR 2001, LB-60).

Keine der genannten Studien und Untersuchungen ergibt jedoch eine klare Antwort hinsichtlich der Funktion der ED_b-Domäne, noch werden Aussagen getroffen über die Identität eines möglichen (möglicher) Rezeptors (Rezeptoren) für die ED_b-Domäne.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Funktion der ED_b-Domäne weiter aufzuklären. Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen möglichen spezifischen Rezeptor für die ED_b-Domäne zu identifizieren. Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, den ED_b-spezifischen Adhäsions-Mechanismus und die Wechselwirkung mit Rezeptormolekülen aufzuklären, die beim Prozeß der Angiogenese beteiligt sein könnten. Weiterhin ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die für die spezifische Bindung verantwortliche ED_b-Region zu identifizieren.

Diese Aufgabe wird gelöst durch

ein Protein,

a) das die Fähigkeit aufweist, spezifisch an die ED_b-Fibronektin-Domäne zu binden;

b) das spezifisch in Endothelzellen exprimiert oder aktiviert ist;

- c) das spezifisch in stromalen Zellen eines Tumors exprimiert oder aktiviert ist;
- d) das spezifisch in Tumorzellen exprimiert oder aktiviert ist;
- e) dessen Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne durch ein Polypeptid inhibiert wird; und

- 5 f) das ein apparentes Molekulargewicht von 120 – 130 kDa für die leichte Kette und 150 – 160 kDa für die schwere Kette, ermittelt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, aufweist.

Insbesondere bevorzugt ist ein Protein,

- 10 a) das die Fähigkeit aufweist, spezifisch an die ED_b-Fibronectin-Domäne zu binden, wobei die Bindungsregion durch mindestens eine Sequenz charakterisiert ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO:1 - 3 umfaßt;

- b) das spezifisch in Endothelzellen exprimiert oder aktiviert ist;

- c) das spezifisch in stromalen Zellen eines Tumors exprimiert oder aktiviert ist;

- d) das spezifisch in Tumorzellen exprimiert oder aktiviert ist;

- 15 e) dessen Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne durch ein Polypeptid inhibiert wird, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO:1 - 3 umfaßt; und

f) das ein apparentes Molekulargewicht von 120 – 130 kDa für die leichte Kette und 150 – 160 kDa für die schwere Kette, ermittelt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, aufweist.

Ganz besonders bevorzugt ist ein Protein,

5 a) das die Fähigkeit aufweist, spezifisch an die ED_b-Fibronectin-Domäne zu binden, und das die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt;

b) das spezifisch in Endothelzellen exprimiert oder aktiviert ist;

c) das spezifisch in stromalen Zellen eines Tumors exprimiert oder aktiviert ist;

d) das spezifisch in Tumorzellen exprimiert oder aktiviert ist;

10 e) dessen Bindung an die ED_b-Fibronectin-Domäne durch ein Polypeptid inhibiert wird, und das die α -Kette des Integrins umfaßt; und

f) das ein apparentes Molekulargewicht von 120 – 130 kDa für die leichte Kette und 150 – 160 kDa für die schwere Kette, ermittelt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, aufweist.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Endothelzellen proliferierende Endothelzellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die stromalen Zellen Tumor-Stroma-Zellen.

Die Aufgabe wird außerdem gelöst durch ein Protein, dessen spezifische Bindung an die ED_b-Fibronektin-Domäne die Adhäsion von Endothelzellen, Tumor-Stromazellen und Tumorzellen vermittelt. Die Bindungsregion kann hier durch mindestens eine Sequenz charakterisiert sein, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die

5 SEQ ID NO: 1 - 3 umfaßt und insbesondere die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

Die Aufgabe wird auch durch ein Protein gelöst, dessen spezifische Bindung an die ED_b-Fibronektin-Domäne die Proliferation von Endothelzellen induziert. Die Bindungsregion kann hier durch mindestens eine Sequenz charakterisiert sein, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 3 umfaßt und insbesondere die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch ein Protein, dessen spezifische Bindung an die ED_b-Fibronektin-Domäne die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen in eine Collagenmatrix induziert, wobei die Bindungsregion durch mindestens eine Sequenz charakterisiert ist. Die Bindungsregion kann hier durch mindestens eine Sequenz charakterisiert sein, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 3 umfaßt und insbesondere die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

Die Aufgabe wird weiterhin gelöst durch ein Protein, das an die ED_b-Fibronektin-Domäne bindet und spezifische Signaltransduktionswege induziert, wobei mindestens ein Gen induziert wird, das für ein Protein codiert, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die

Fokale Adhäsionskinase,

CD6-Ligand (ALCAM),

die α -Kette des Vitronektin-Rezeptors,

die integrierte alpha 8 Untereinheit und

einen/den Vorläufer für Follistatin-verwandtes Protein

umfaßt.

- 5 Die Bindungsregion kann hier durch mindestens eine Sequenz charakterisiert sein, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 - 3 umfaßt und insbesondere die $\alpha 2\beta 1$ -Kette des Integrins umfaßt.

Es wird bevorzugt, daß bei der Induktion spezifischer Signaltransduktionswege mindestens eines der genannten Gene mindestens einfach induziert wird. Bevorzugter wird dabei mindestens eines der genannten Gene zweifach induziert.

Die Aufgabe wird auch gelöst durch einen Antikörper, der in der Lage ist, an ein Protein gemäß der vorliegenden Erfindung zu binden.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch einen Antikörper, der in der Lage ist, an ein Protein zu binden, das eine Aminosäuresequenz umfaßt, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 und SEQ ID NO:4 umfaßt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper in der Lage, Effekte zu inhibieren, die für die ED_b-Domäne spezifisch sind.

Es wird bevorzugt, daß die Bindung und Inhibierung in vitro und/oder in vivo erfolgt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper monoklonal oder rekombinant.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper ein scFv-Fragment.

5 Die Aufgabe wird auch gelöst durch eine Zelle, die ein Protein gemäß der vorliegenden Erfindung exprimiert.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch eine Zelle, die einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung exprimiert.

Außerdem wird die Aufgabe durch einen Phagen gelöst, der einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung exprimiert.

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123
1124
1125
1126
1127
1128
1129
1130
1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140
1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380
1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025
2026
2027
2028
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2040
2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065
2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100
2101
2102
2103
2104
2105
2106
2107
2108
2109
2110
2111
2112
2113
2114
2115
2116
2117
2118
2119
2120
2121
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129
2130
2131
2132
2133
2134
2135
2136
2137
2138
2139
2140
2141
2142
2143
2144
2145
2146
2147
2148
2149
2150
2151
2152
2153
2154
2155
2156
2157
2158
2159
2160
2161
2162
2163
2164
2165
2166
2167
2168
2169
2170
2171
2172
2173
2174
2175
2176
2177
2178
2179
2180
2181
2182
2183
2184
2185
2186
2187
2188
2189
2190
2191
2192
2193

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Antwort bzw. die Kontrollantwort das Anhaften der Zellen an Oberflächen, die mit der ED_b-Fibronektin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens umfaßt eine Bindungsregion der ED_b-Fibronektin-Domäne die Sequenzen SEQ ID NO:1 - 4 oder Teile davon.

Es wird bevorzugt, daß die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation der Zellen an Oberflächen umfaßt, die mit der ED_b-Fibronektin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen in einer Collagenmatrix, die mit der ED_b-Fibronektin-Domäne oder Teilen davon versetzt wird.

- 15 Es ist bevorzugt, daß die Verbindungen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Antikörper, Antikörperfragmente, artifizielle Antikörper, Peptide, niedermolekulare Verbindungen, Aptamere und Spiegelmere umfaßt.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Antikörper rekombinante Antikörper.

Es wird bevorzugt, daß die Antikörper ausgewählt sind aus der Gruppe, die scFv und Fragmente davon umfaßt.

- 20 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch ein Verfahren zum Screenen auf Verbindungen, die an die ED_b-Fibronektin-Domäne binden, wobei das Verfahren umfaßt:

a) In-Kontakt-Bringen von Zellen mit einer festgelegten Konzentration eines Proteins, das die ED_b-Fibronektin-Domäne oder ein Protein mit einer der in SEQ ID NO:1 – 4 dargestellten Sequenzen umfaßt, in der Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von einer oder mehrerer der Verbindungen; und

- 5 b) Nachweisen von Unterschieden in der Antwort der Zellen auf das Protein, das die ED_b-Fibronektin-Domäne oder ein Protein mit einer der in SEQ ID NO:1 – 4 dargestellten Sequenzen umfaßt, in der Anwesenheit der Verbindungen im Vergleich mit der Kontrollantwort der Zellen auf das Protein, das die ED_b-Fibronektin-Domäne oder ein Protein mit einer der in SEQ ID NO:1 – 4 dargestellten Sequenzen umfaßt, in der Abwesenheit dieser Verbindungen, wobei

die Zellen ein Protein gemäß der vorliegenden Erfindung exprimieren oder

eine Nukleinsäure, die für dieses Protein codiert, umfassen, und

wobei die Antwort bzw. die Kontrollantwort durch einen Rezeptor der ED_b-Fibronektin-Domäne vermittelt wird.

- 15 Dabei ist bevorzugt, daß die Antwort bzw. die Kontrollantwort das Anhaften der Zellen an Oberflächen umfaßt, die mit der ED_b-Fibronektin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

Monoklonale Antikörper wurden mittels Standard-Methoden der Hybridomatechnologie hergestellt und immunhistologisch auf humanem Tumor-Cryoschnitten charakterisiert (s. Fig.13).

Exemplarisch: AK AM-EDBr-2 (murines IgG 1/kappa)

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation der Zellen an Oberflächen, die mit der ED_b-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon beschichtet sind.

- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Antwort bzw. die Kontrollantwort die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen in einer Collagenmatrix, die mit der ED_b-Fibronectin-Domäne oder Teilen davon versetzt wird.

Es ist bevorzugt, daß die Verbindungen ausgewählt sind aus der Gruppe, die Antikörper, artifizielle Antikörper, Antikörperfragmente, Peptide, niedermolekulare Substanzen, Aptamere und Spiegelaptamere umfaßt.

Die Aufgabe wird weiterhin gelöst durch die Verwendung einer Nukleinsäure, die für ein Protein codiert, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne oder die ED_b-Fibronectin-Domäne binden.

Die Aufgabe wird auch gelöst durch die Verwendung eines Proteins gemäß der vorliegenden Erfindung bzw. eines Antikörpers gemäß der vorliegenden Erfindung zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne oder die ED_b-Fibronectin-Domäne binden.

- 20 Ebenso gelöst wird die Aufgabe durch die Verwendung einer Zelle gemäß der vorliegenden Erfindung, zum Screenen auf Verbindungen, die an einen Rezeptor der ED_b-Fibronectin-Domäne oder die ED_b-Fibronectin-Domäne binden.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung einer Nukleinsäure, die für ein Protein codiert, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe,

die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv-Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins gemäß der vorliegenden Erfindung zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv-Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke. Unter therapeutischem Zweck ist u. a. die anti-angiogene Behandlung mit Verbindungen, die die spezifische Interaktion zwischen ED_b und dem Rezeptor inhibieren, gemeint. Die Antikörper sind hierbei sowohl gegen den Rezeptor als auch gegen ED_b gerichtet, wobei die Peptide der Sequenz SEQ ID NO:1 - 3 und stabilisierte Derivate davon sowie niedermolekulare Verbindungen zur Anwendung kommen.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung einer Zelle gemäß der vorliegenden Erfindung zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv-Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Phagen gemäß der vorliegenden Erfindung zum Entwickeln von Antikörpern oder scFv-Fusionsproteinen für diagnostische oder therapeutische Zwecke.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, für eine pro-angiogene Therapie.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, für diagnostische Zwecke.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, in der Gentherapie.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zum Beschichten von Oberflächen, an die Endothelzellen binden.

Dabei ist bevorzugt, daß das Beschichten *in vitro* oder *in vivo* erfolgt.

- 5 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, in Zellkulturen.

Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zusammen mit mindestens einem Transplantat.

Dabei ist bevorzugt, daß das Transplantat ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gefäß(e), Haut, Cornea, Nieren, Leber, Knochenmark, Herz, Lungen, Knochen, Thymus, Dünndarm, Pankreas, andere innere Organe sowie Teile und Zellen davon umfaßt.

- 15 Die Aufgabe wird ebenso gelöst durch die Verwendung eines Proteins, das eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID NO: 1 – 4 umfaßt, zusammen mit mindestens einem Implantat.

Dabei ist bevorzugt, daß das Implantat ausgewählt ist aus der Gruppe, die Lungenimplantate, künstliche Herzschrittmacher, künstliche Herzklappen, Gefäßimplantate, Endoprothesen, Schrauben, Schienen, Platten, Drähte, Nägel, Stäbe, künstliche Gelenke, Mammaimplantate, künstliche Schädelplatten, künstliche Zähne, Zahnfüllungen und Zahnbrücken umfaßt.

Unter „Effekten, die für die ED_b-Fibronektin-Domäne spezifisch sind“ werden alle solche Effekte verstanden, die durch die ED_b-Fibronektin-Domäne, nicht aber

durch EIII7, EIII8, etc. hervorgerufen werden. Ein solcher Effekt ist bspw. in Chen et al., 1998 (aaO) beschrieben, d.h. eine schnelle Tyrosin-Phosphorylierung mehrerer intrazellulärer Proteine, im Gegensatz zu der eher langsamen Phosphorylierung nach einer durch die Domänen EIII8-9-10 vermittelten Adhäsion. Unter „niedermolekularen Verbindungen“ werden alle Verbindungen verstanden, deren relative Molekülmasse unter etwa 1000 - 1200 liegt. Unter „Aptameren“ werden auf Nukleinsäuren aufgebaute Moleküle verstanden, die in der Lage sind, als hochspezifische Liganden für eine große Anzahl von Biomolekülen zu fungieren. Unter einer „pro-angiogenen Therapie“ wird jede Therapieform verstanden, bei der die

Angiogenese gefördert werden soll. Unter einer „anti-angiogenen Behandlung/Therapie“ wird jede Behandlungs-/Therapieform verstanden, die auf eine Inhibierung der Angiogenese abzielt. Unter „Gentherapie“ wird jede Form der Therapie verstanden, die auf die Ausschaltung einer genbedingten Fehlfunktion bzw. auf die Wiederherstellung einer normalen Genfunktion bei Erkrankungen abzielt, die durch die Eliminierung oder Bereitstellung eines Proteins zu beeinflussen sind. Sie kann das Einschleusen von Fremd-DNA in Körperzellen beinhalten, ist jedoch nicht als hierauf beschränkt anzusehen. Unter „Zellkulturen“ sollen sowohl Zellkulturmedien als auch Zellkulturgefäße verstanden werden. Bevorzugt sind die Zellkulturgefäße ausgewählt aus der Gruppe, die Zellkulturflaschen, -schalen, -näpfe, -platten, Mikrotiterplatten, 96-Napf-Platten, Zellkulturkolben und Bioreaktoren umfaßt.

„Diagnostische Zwecke“ sind alle Zwecke, die dem Erkennen eines Zustandes eines Organismus/Organs/einer Zelle bzw. dem Zuordnen eines aktuellen Zustandes eines Organismus/Organs/einer Zelle zu einer bestimmten Zustandskategorie (z. B. einer bestimmten Krankheit) dienen, beispielsweise kann dies der Einsatz eines Kits/chemischer Reagenzien/einer Meßeinrichtung sein, zum Bestimmen einer physikalischen Größe, wie Temperatur etc., oder einer chemischen Größe, wie Konzentration etc., soll jedoch nicht als hierauf beschränkt angesehen werden.

„Therapeutische Zwecke“ sind alle Zwecke, die der Verbesserung bzw. der Heilung eines Krankheitszustandes eines Organismus/Organs/einer Zelle dienen. Unter dem Begriff „Verwendung eines Proteins zusammen mit einem Implantat“ ist entweder eine zeitlich oder eine räumlich identische Verwendung gemeint. Bei-

spielsweise können Proteinmoleküle an das Implantat bei dessen „Einbau“ in den Körper befestigt sein, oder aber sie können räumlich vom Implantat getrennt, aber zur gleichen Zeit wie dem „Einbau“ des Implantats verabreicht werden (Injektionen etc.).

- 5 Die Erfindung wird nunmehr detailliert anhand der folgenden Beispiele und Figuren beschrieben. Dabei zeigt:

- Fig. 1 eine schematische Darstellung der in dieser Studie verwendeten Wiederholungssequenzen vom Typ III;
- Fig. 2 die Resultate eines Proliferationsassay unter dem Einfluß der ED_b-Fibronectin-Domäne (ED-B) auf Endothelzellen bzw. menschliche Stromazellen auf verschiedenen Substraten;
- Fig. 3 die Resultate eines Sprießtests (tube formation test) von Endothelzellen unter dem Einfluß von ED-B;
- Fig. 4 die Resultate eines Anheftungstest, bei dem das Anheften von Endothelzellen an mit ED-B beschichteten Oberflächen getestet wurde;
- Fig. 5 die Resultate eines Test, ähnlich zu dem in Fig. 4, mit der Ausnahme, daß die Zelle mit verschiedenen synthetischen Peptiden vorinkubiert wurden, deren Sequenzen Teilsequenzen der ED_b-Fibronectin-Domäne sind;
- 20 Fig. 6 die in Fig. 5 verwendeten Teilsequenzen der synthetischen Peptide aus der ED_b-Fibronectin-Domäne;
- Fig. 7 die Resultate eines Anheftungstests von Endothelzellen an verschiedene synthetische ED-B-Peptide;
- Fig. 8 die Lage der in Fig. 6 - 7 ermittelten synthetischen Peptide in einer Modellstruktur der Peptid-Hauptkette von ED-B;
- 25

Fig. 9 die Wirkung von der ED_b-Fibronektin-Domäne und eines aus Loop 5 stammenden Peptids (SEQ ID NO:2) auf die Induktion von Kapillar-ähnlichen Strukturen in einem Sprießtest (tube formation test);

Fig. 10 die Resultate zweier Affinitäts-Chromatographie-Läufe unter Verwendung von Fn-7-8-9 bzw. Fn-7-B-8-9 von Zell-Lysaten von Oberflächen-markierten menschlichen Hautendothelzellen;

Fig. 11 die Resultate zweier Affinitäts-Chromatographie-Läufe unter Verwendung von Fn-7-8-9 bzw. Fn-7-B-8-9 von Zell-Lysaten von Oberflächen-markierten menschlichen Haut-Stroma-Zellen.

Fig. 12 Affinitätschromatographische Reinigung des ED_bB-Rezeptors.

Fig. 13 Immunhistologisch charakterisierte humane Tumor-Cryoschnitte.

Fig. 1 zeigt verschiedene, in dieser Studie verwendete rekombinante Fibronektin-Fragmente, die unterschiedliche Domänen-Struktur mit unterschiedlichen Wiederholungssequenzen vom Typ III aufweisen. Dabei umfassen Fn-7-B-8-9 die Fibronektin-Domänen 7, ED_b, 8 und 9, Fn-7-8-9 die Domänen 7, 8 und 9, ED-B die Domäne ED_b, Fn-10 die Domäne 10 und Fn-6 die Domäne 6. Diese Proteine wurden als mit einem His-Tag versehene Proteine in *E. coli* exprimiert und auf einer Nickel-Chelat-Sepharosesäule aufgereinigt. Die in dieser Studie verwendeten Nummernbezeichnungen entsprechen den in der Literatur verwendeten. Dabei bezeichnen die Abkürzungen FN-B, ED-B, EDB und ED_b alle jeweils die ED_b-Fibronektin-Domäne und sind als synonym anzusehen.

Fig. 2 zeigt die Resultate eines Proliferationsassay, bei dem die Wirkung der ED_b-Fibronektin-Domäne (ED-B) auf die Proliferation von Endothelzellen (EC) bzw. Stroma-Zellen (SC) untersucht wurde. 1000 Zellen pro Napf wurden in 96-Napf-Platten inkubiert. Lösliches ED-B (10 µg/l) wurde dem Medium während des Proliferationsassays zugegeben. Nach drei Tagen wurde die Zellzahl mit dem MTS-Assay bestimmt. Die Proliferation der Zellen wurde durch basischen Fibronektin-Wachstumsfaktor (bFGF) induziert. Es zeigte sich, daß ED-B keine Wirkung in Abwesenheit von bFGF hatte, und ebenso konnte keine Wirkung für die Fibronektin-

- tin-Domäne 10 vom Typ III in Anwesenheit von bFGF auf die Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Wirkung von ED-B auf menschliche Endothelzellen-Proliferation konnte bei Zellen festgestellt werden, die auf Gelatine ausplattiert worden waren (EC/Gelatine), ebenso bei Zellen, die auf Collagen ausplattiert worden waren (EC/Collagen), wobei jedoch letzterer Effekt nicht so deutlich war, wie beim Ausplattieren auf Gelatine. Bei menschlichen Stroma-Zellen auf Gelatine (SC/Gelatine) fand eine Proliferation bereits in Abwesenheit von bFGF statt, die deutlich über der von menschlichen Endothelzellen lag. Sie konnte durch die Zugabe von bFGF bzw. bFGF + ED-B nicht gesteigert werden. Als Maß für die Zellzahl wurde die Extinktion bei 490 nm bestimmt.

Für den Proliferationsassay wurde folgende experimentelle Methode befolgt:

Material: 96-Napf-Platte (mit flachem Boden), Nunc

Medium: MCDB 131, Pen/Strep, Amphotericin (0,25 µg/ml), Heparin (20 µg/ml), hitze-inaktiviertes FCS (5 %)

15 Methode:

- Zellen, 500-1000 pro Napf (96-Napf-Platte) in 100 µl, werden für 3 Tage in Medium mit bFGF (1 - 3 ng/ml) oder VEGF (30 - 50 ng/ml) kultiviert. Die genaue Menge sollte für jede Charge durch Titration bestimmt werden: optimal ist die minimale Konzentration, die maximale Proliferationsstimulation erreicht. Eine Synchronisation der Zellen vor dem Experiment ist nicht notwendig, kann aber gemacht werden. Nach 3 Tagen wird die Zellzahl mit dem MTS-Kit (Promega) nach Herstellerangaben bestimmt. Es empfiehlt sich, die Absorption bei mehreren Zeitpunkten zu messen, um eine maximale Absorption im linearen Bereich zu erhalten (0,5; 1; 2; 4 Stunden).

25 Kontrollen:

Negative Kontrolle, kein Mitogen (keine Proliferation) (-bFGF/VEGF)

Positive Kontrolle, mit Mitogen (maximale Stimulation) (+bFGF/VEGF)

Fig. 3 zeigt die Wirkung von ED-B auf das Sprießen von Endothelzellen aus Sphäroiden. Hierzu wurden HUVEC-Sphäroide (Human Umbilical Vein Endothelial Cells = menschliche Nabelschnur-Endothelzellen) in Collagen eingebettet und durch die Zugabe von 10 µg/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) zum Sprießen induziert in Ab- oder Anwesenheit von 6 µg/ml ED-B. Es zeigte sich, daß durch die Zugabe von bFGF alleine das Sprießen induziert und dann durch die Zugabe von ED-B weiter stimuliert werden konnte (+ bFGF + ED-B).

Für den Sprießtest (tube formation test) wurde folgende experimentelle Methode verwendet:

10 Material:

Methylcellulose, höchste Viskosität (Sigma)
 Trypsin/EDTA für Zellkultur (Gibco)
 Rundboden 96-Napf-Platten (Greiner #650185)
 rekombinantes bFGF (Gibco #13256-029)
 rekombinantes VEGF (R & D System)
 Anti-Ratte-CD31 (RDI #RDI-CD31TLD)
 Heparin (Gibco #15077-027)

Lösungen:

20 PBS/Antibiotika: Zellkultur-PBS, 10 x Pen/Strep, 2,5 µg/ml Amphotericin
 1 % Gelatine (Difco, autoklavieren und nach Abkühlung mit Pen/Strep und Amphotericin (0,25 µg/ml) versetzen)

Medium: MCDB 131, Glutamin, Pen/Strep, Amphotericin (0,25 µg/ml), Heparin (20 µg/ml), hitzeinaktiviertes FCS (10 %)

25 Wachstumsmedium: Medium mit 2 ng/ml bFGF und 10 ng/ml VEGF

Zellen:

HUVEC

Dermale MVEC (Passage >4)

Methode:

Endothelzellen werden mit Trypsin/EDTA abgelöst und auf 5000 Zellen/ml in Medium mit 0,24 % Methylcellulose verdünnt. Je 200 μ l (1000 Zellen) werden in Näpfen einer Greiner-Platte gegeben und über Nacht inkubiert. Runde Zellhaufen (Sphäroide) werden mit einer 1 ml-Pipette mit abgeschnittener Spitze geerntet und abzentrifugiert. Sphäroide werden in 1,2 % Methylcellulose/FCS resuspendiert und mit neutralisiertem Collagengel gemischt. ED_b und bFGF wurden co-polymerisiert.

Wie aus der Figur deutlich wird, erfolgt durch die Zugabe von ED-B eine deutliche Steigerung des Sprießens über das durch bFGF induzierte Maß hinaus.

Fig. 4 zeigt die Resultate eines Adhäsionstest von Endothelzellen an Mikrotiter-napf-Platten, die mit ED-B beschichtet waren. Hierzu wurden Endothelzellen aus ihrem ursprünglichen Kulturgefäß durch Trypsinisierung (Trypsin/EDTA) von ihrem Substrat gelöst und dann in Mikrotiternapf-Platten, die mit verschiedenen Konzentrationen (0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 40 μ g/ml) ED-B beschichtet waren, inkubiert und für eine Stunde zum Anhaften belassen. Als eine Negativ-Kontrolle dienten Näpfe, die mit 1 mg/ml BSA (bovinem Serumalbumin) beschichtet waren; die Adhäsion an BSA (< 10 %) wurde substrahiert.

Das Anheften wurde durch Färbung mit Kristallviolett quantifiziert, gefolgt von einer Lyse mit SDS. Die Quantifizierung erfolgte durch Messen der Extinktion bei 595 nm. Eine in der Figur waagrecht angebrachte Linie bei $A_{595} \text{ nm} \approx 1,06$ zeigt die 100 %ige Adhäsion an Plasma-Fibronectin an.

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt an, daß die Zellen an den mit ED-B beschichteten Oberflächen anhaften, was einen Rezeptor auf der Zelloberfläche für ED-B nahelegt.

Für den Anheftungs/Adhäsionstest wurde folgende experimentelle Methode verwendet:

Lösungen:

1 % BSA (Sigma, Ethanol-präzipitiert)

2 % Serum in PBS (oder eine Trypsin-Neutralisationslösung)

Medium: MCDDB 131, Pen/Strep, Amphotericin (0,25 µg/ml), Heparin (20 µg/ml), 0,1 % BSA (Sigma, Äthanol-präzipitiert)

0,1 % Kristallviolett, 2 % Glutaraldehyd in PBS, sterilfiltriert

2 % SDS

Methode:

Näpfe einer 96-Napf-Platte (Nunc) werden für eine Stunde bei 37°C mit Protein belegt. Bei kleinen Proteinen (<20 kDa) oder Peptiden empfiehlt es sich, diese auf der Platte trocknen zu lassen (über Nacht ohne Deckel unter der Sterilbank). Danach werden die Näpfe mit 1 % BSA für 1 h bei 37°C abgesättigt. Zellen werden mit 1 X Trypsin abgelöst, mit 2 % Serum zur Inaktivierung des Trypsins gewaschen, und in Medium resuspendiert. Wenn Antikörper oder Peptide getestet werden sollen, werden die Zellen in Suspension mit diesen für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Pro Napf (96-Napf-Platte) werden 10^4 Zellen in einem Volumen von 50 - 100 µl für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen, die Platte zum Abtropfen auf einem Papierhandtuch für 1 min umgedreht stehen lassen und angeheftete Zellen werden mit Kristallviolett/Glutaraldehyd für 15 min gefärbt und fixiert. Die Näpfe werden 3mal mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend durch Zugabe von 2 % SDS lysiert (15 min auf dem Schüttler). Die Absorption bei 595 nm wird gemessen. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser können die Zellen, falls erwünscht, erneut angefärbt werden.

Kontrollen:

Negative Kontrolle: Leer-Näpfe (BSA-Kontrolle)

Positive Kontrolle: Plasma-Fibronektin (2,5 µg/ml)

$$\% \text{ Adhäsion} = A_{595} (\text{Probe}) : 100 \times A_{595} (\text{Fibronektin})$$

Fig. 5 zeigt die Resultate eines Test, ähnlich dem aus Fig. 4 mit der Ausnahme, daß vor dem Anheften an mit ED-B beschichteten Mikrotiterapf-Platten die Endothelzellen mit 250 µM verschiedener synthetischer Peptide vorinkubiert wurden, deren Sequenz eine Teilsequenz der ED_b-Fibronektin-Domäne war. Die Anheftung wurde durch die Bestimmung der Extinktion bei 595 nm (A_{595}) bestimmt. Die in der Figur aufgetragenen Peptidbezeichnungen werden in Fig. 6 erläutert. Dabei entspricht Peptidsequenz Nr. 043 der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, Peptidsequenz Nr. 553 der SEQ ID NO:2, Peptidsequenz Nr. 038 der SEQ ID NO:3. Ein hoher A_{595} -Wert entspricht einer nicht-inhibierten Anhaftung, während ein niedriger A_{595} -Wert einer Inhibition der Anhaftung durch das entsprechende Peptid entspricht.

Die für Fig. 4 beschriebene Methode wurde befolgt.

Fig. 6 zeigt die der Gesamtsequenz der ED_b-Fibronektin-Domäne entnommenen Teilsequenzen der synthetischen ED-B-Peptide mit den dazu gewählten Sequenzbezeichnungen. Es wird der Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren verwendet.

Fig. 7 zeigt die Resultate eines Tests, ähnlich zu dem in Fig. 5, außer, daß hier die Mikrotiterapf-Platten nicht mit der ED_b-Fibronektin-Domäne beschichtet waren, sondern mit den sich im Test aus Fig. 5 als inhibitorisch erwiesenen Peptiden, bzw. nicht-inhibitorisch erwiesenen Peptide vor-inkubiert wurden und somit mit diesen beschichtet wurden. Dabei zeigt es sich, daß die Zellen in diesen Tests nunmehr bei einer Beschichtung mit jeweils eines der inhibitorischen Peptide Anheftung zeigen, gemessen am A_{595} -Wert, während ein aus Fig. 5 als nicht-inhibitorisches erwiesenes Peptid zu keiner Anheftung führt.

Die für Fig. 4 beschriebene Methode wurde befolgt.

Fig. 8 zeigt eine Modellstruktur der ED_b-Fibronektin-Domäne (ED-B), aus dem die Lage der inhibitorischen Peptide Nr. 1 (= SEQ ID NO:1), Nr. 2 (= SEQ ID NO:2) und Nr. 3 (= SEQ ID NO:3) hervorgeht. Es zeigt sich, daß sich diese inhibitori-

schen Peptide auf Loop 1 bzw. Loop 5 der ED-B-Struktur befinden und damit die Region der Domäne identifizieren, über die eine Bindung zur Zelle bzw. dem auf der Zelle befindlichen Rezeptor stattfindet. Die in Fig. 8 gezeigte Modellstruktur der ED-B-Domäne beruht auf einer bereits ermittelten Struktur der Fibronectin-Domäne 7 vom Typ III. N-T und C-T stehen für N- bzw. C-Terminus.

Fig. 9 zeigt die Resultate eines Tests, bei dem die Wirkung der Zugabe von ED-B und dem zuvor als inhibitorisch ermittelten Peptid Nr. 2 sowie die Zugabe der Fibronectin-Domäne 6 vom Typ III auf die Induktion von Kapillar-ähnlichen Strukturen (tube formation) im Sprießtest untersucht wird. Es zeigt sich, daß über dem basalen, durch bFGF induzierten Eindringen in Collagen-Gele die größte Wirkung durch das Anheftungs-inhibitorische Peptid SEQ ID NO:2 erzeugt wird. Dieses Peptid hat also eine stimulatorische Wirkung auf das Eindringen von Endothelzellen in Collagen-Gele. Dieses Peptid entspricht daher der Bindungsregion von ED_b und stimuliert, in Analogie zu ED_b selbst, das Eindringen von Endothelzellen in das Collagen.

Die für Fig. 3 beschriebene Methode wurde befolgt.

Fig. 10 zeigt die Resultate einer Affinitätschromatographie von Zell-Lysat aus Oberflächen-markierten, menschlichen Hautendothelzellen. Hierzu wurden proliferierende, an der Zelloberfläche biotinylierte Endothelzellen mit einem Detergenz lysiert und einer Affinitätschromatographie unterzogen, bei der kurze Fragmente Fibronectin mit oder ohne die eingefügte ED_b-Fibronectin-Domäne an Sepharose gekoppelt waren (mit der ED_b-Fibronectin-Domäne = Fn-7-B-8-9, ohne die ED_b-Fibronectin-Domäne = Fn-7-8-9). Es konnte gezeigt werden, daß ein biotinyliertes Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 120 - 130 kDa spezifisch an das ED-B-enthaltende Fragment bindet (siehe Pfeil). Die Elution erfolgt mittels EDTA. Es wurden mehrere, im folgenden beschriebene Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden anschließend SDS-PAGE unterzogen und mit Western-Blot mit Streptavidin-Peroxidase- und Chemolumineszenz (ECL) untersucht. Die Spuren 1 und 5 zeigen Prä-Elutions-Fraktionen, während die Spuren 2, 3, 4 bzw. 6, 7, 8 die eluierten Fraktionen 1, 2 und 3 zeigen. Spuren 1 - 4 zeigen die Chromatographie mit Fn-7-8-9, während Spuren 5 - 8 die Chromatographie mit Fn-7-B-8-9 zeigen. Das hier gezeigte Resultat ist ein starkes Indiz dafür, daß die promi-

nente Bande mit einem Molekulargewicht zwischen 120 - 130 kDa ein Protein ist, das spezifisch an ein ED_b-enthaltende Fibronektin-Fragment bindet und somit einen Rezeptor für die ED_b-Fibronektin-Domäne darstellt.

Für die Biotinylierung und Lyse der Endothelzellen wurde folgende experimentelle

5 Methode befolgt:

Material: Biotinamidohehexansäure-3-sulfo-N-Hydroxysuccinimid-Ester; Sigma
 PBS w/o Mg/Ca (Dulbecco)
 Hepes-Puffer: 20 mM Hepes pH 7,6, 1 mM CaCl₂, 1 µM MgCl₂, 0,1
 % NaN₃,
 10 1 % CHAPS (V/V)

und Boehringer vollständiger Mini Protease-Inhibitor, EDTA-frei,
 Cocktail-Tabletten

Methode: Die Zellkulturflaschen werden vor und nach dem Biotinylieren jeweils
 3mal mit PBS w/Ca + Mg gewaschen. Vor dem letzten Waschvorgang wird der
 Biotinpuffer (1mg/15ml PBS) angesetzt. In jede der Flaschen werden langsam 5
 15 ml des Puffers (für 225 cm²) oder 12,5 ml (500 cm² Platten) in die Mitte des Bo-
 dens pipettiert, so daß sich das Volumen über den ganzen Flaschenboden unter
 Schwenken verteilen kann. Dann wird die erste Kulturflasche mit der Hälfte des
 Lysepuffervolumens behandelt. Der Puffer wird ebenfalls in die Mitte des Fla-
 20 schenbodens pipettiert und über die gesamte Oberfläche verteilt. Dann werden die
 Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt. Anschließend wird das Gesamt-
 volumen der 1. Kulturflasche in die 2. Flasche pipettiert, wo der Vorgang dann
 wiederholt wird. Nach der letzten Flasche wird das Volumen in ein 50 ml koni-
 sches Zentrifugenröhrchen überführt. Mit der anderen Hälfte des Lysepuffers wird
 25 dieser Vorgang in allen Kulturflaschen wiederholt (ohne Zellschaber) und das
 Endvolumen ebenfalls in Zentrifugenröhrchen gegeben. Zentrifugiert wird in 50 ml
 konischen Zellkulturröhrchen bei 3000 U/min, 5 min bei RT (Heraeus-
 Tischzentrifuge). Das Lysat wird abpipettiert und sollte idealerweise sofort für die
 Affinitätschromatographie eingesetzt werden (kann notfalls aber auch bei -80°C
 30 eingefroren werden).

Für die kovalente Kopplung von Proteinen an Sepharose wurde folgendes Vorgehen gewählt:

Material: aktivierte CH Sepharose 4 B Pharmacia Biotech,

Code-No. 17-0490-01

5 1 mmol HCl, 2,2 % NaHCO₃

Methode: Die HCl wird im Eisbad gekühlt, die Sepharose läßt man auf Raumtemperatur erwärmen.

Dann wird die Sepharose mit 1 mmol HCl gewaschen. Pro ml Sepharose benötigt man 10 ml HCl. Die Sepharose läßt man langsam in das vorgekühlte Röhrchen rieseln, wo sie dann für etwa 15 Minuten aufquillt. (1 g Sepharose entspricht 3 ml gequollener Sepharose). Anschließend wird das Röhrchen für 1 Min. bei 800 U zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen.

Dieser Vorgang wird 3mal wiederholt.

Nach dem 3. Waschen wird erneut HCl zugegeben, das Röhrchen wird geschwenkt und 3 - 5 Min. bei 800 U zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet wird mit 20 ml Millipore-Wasser gelöst und in 2 neue Zentrifugenröhrchen überführt (je 1 Röhrchen für 7-EDB-8-9 Sepharose und für 7-8-9 Sepharose, d.h. Sepharose, an die ein Polypeptid mit den Repeats III7, ED₆, III8 und III9 bzw. III7, III8 und III9 gekoppelt ist.). Die Röhrchen werden sofort wieder abzentrifugiert, der Überstand wird abpipettiert und die 1 -5 mg Protein/ml Sepharose können gekoppelt werden.

(d. h. 2 mg Protein/ml Sepharose 7-8-9

2 mg „ „ 7-EDB-8-9)

Die Röhrchen werden durch Umschwenken gemischt. Dann erfolgt zügig die Zugabe von 2,2 % NaHCO₃. (50 µl/ml Gel). Dadurch wird die restliche HCl neutralisiert. Die Röhrchen werden umgeschwenkt und bei höchster Stufe auf einem „Wipptisch“ für 1 – 5 Std. durchgemischt.

Anschließend werden die Röhrchen wieder abzentrifugiert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration, die bei der kovalenten Kopplung an Sepharose eingesetzt werden soll, wurde ein Bradford-Test durchgeführt:

Material: BSA-Stammlösung 2 mg/ml
Bradford Reagenz

Methode: Die BSA-Lösung wird wie folgt auf eine Nunc-Immuno-Plate (Maxi Sorp) aufgetragen: 5 g-4 g-3 g-2 g-1 g (80 Öl Vol. + 20 Öl Assay)
Vorverdünnung für BSA: 5 g/50 l = 0,1 mg/ml
Die Stammlsg. 2 mg/ml wird durch eine 1:20-Verdünnung auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt.

Zur Durchführung der Affinitätschromatographie bzw. zur Elution wurde folgendes Vorgehen gewählt:

a) Affinitätschromatographie

Material: aktivierte CH Sepharose 4B Pharmacia Biotech,
Code-No. 17-0490-01
Puffer A (20 mM Hepes pH 7,6, 1 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0,1 % NaN₃)
Puffer B (Puffer A + 150 mM NaCl + 0,1 % Chaps)
Puffer C (Puffer A + 0,1 % Chaps)
PH 4-Puffer (Millipore-Wasser + 0,1 % Eisessig + 0,1 % Chaps)
EDTA-Puffer (Puffer A + 200 mM EDTA pH 8,5 + 0,1 % Chaps)

Methode: Das Lysat wird zunächst 3 x über die Säule geschickt.

Unter der Säule befindet sich ein Röhrchen zum Auffangen der Flüssigkeit. Die ersten 2 ml des Lysats werden vorsichtig mit einer Eppendorfpipette auf das Gel gegeben. Für das weitere Lysatvolumen verwendet man eine Meßpipette. Zu beachten ist, daß die Säule gerade ist. Wird die Säule zum ersten Mal benutzt, wird vor dem eigentlichen Durchlauf ein „Trockendurchlauf“ mit allen proteinfreien Puffern durchgeführt. Eine Säulenfüllung sollte maximal 5 x benutzt werden.

Wenn das Lysat eingefroren (-80°C) vorliegt, wird es zunächst im Wasserbad erwärmt und dann zentrifugiert (5 min. bei 3000 U).

Frisches Lysat ist jedoch immer dem eingefrorenen vorzuziehen.

Von dem Lysat werden 500 μl in ein Eppendorfgefäß abpipettiert.

- 5 Dies dient zur Untersuchung des Lysats vor und nach der Chromatographie..

Werden 2 Säulen verwendet (je eine für 7-8-9 Sepharose und für 7-B-8-9 Sepharose), wird jeweils die Hälfte des Lysatvolumens über jede der Säulen geschickt. Beide Säulen sollten dieselbe Flußrate haben. Ist dies nicht der Fall, wird die „langsamere“ Säule entsprechend lange geschlossen. Die ideale Flußrate beträgt 0,2 - 0,5 ml/min.

Ist das Lysat 3 x durch die Säule gelaufen, wird von dem Durchlauf, nachdem er gemischt wurde, ebenfalls 500 μl in ein Eppendorfgefäß pipettiert, damit auch hier eine Untersuchung erfolgen kann.

Anschließend werden je 10 Säulenvolumina Puffer B und Puffer C über die Säule geschickt. Danach ist der Waschvorgang abgeschlossen.

b) Elution

Präelution: Puffer C wird über die Säule geschickt, damit festgestellt werden kann, ob trotz der Waschprozedur noch Proteine verblieben sind. 500 μl werden in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen. (Bei 2 Säulen entsprechend 2 x 500 μl).

- 20 EDTA-Elution: EDTA komplexiert die Ca- und Mg-Ionen. Dadurch werden die Endothelzell-Proteine eluiert, die Ca und Mg zur Bindung benötigen. 2 x 4 ml EDTA-Puffer werden über die Säule (bzw. über beide Säulen) geschickt und in 2 Fraktionen (E1 u. E2 / BE1 u. BE 2) in Falcon-Röhrchen aufgefangen. Dann wird der Röhrcheninhalt gemischt und 5000 μl werden in ein (bzw. 2) Eppendorfgefäß(e) abpipettiert.

pH 4-Elution: Der eigentliche pH-Wert des Puffers beträgt 3,7. Außerhalb des neutralen pH-Bereiches (pH 6 - 8) kann man die Bindung des Rezeptors an sein

Protein hemmen. Auch hier werden wie bei der EDTA-Elution 2 x 4 ml PH 4-Puffer über die Säule geschickt, in 2 Fraktionen gesammelt und jeweils 500 µl abpipetiert (4,1 u. 4,1 / B 4,1 und B 4,2).

5 Anschließend werden 3 Säulenvolumen Puffer A über die Säule gegeben, damit die Säure herausgewaschen wird. Das letzte Säulenvolumen verbleibt in der Säule. Die Säule wird geschlossen und im Kühlschrank verwahrt.

Die 500 µl-Fraktionen in den Eppendorfgefäßen werden für mind. 15 Min. bei -80°C eingefroren und anschließend in einem „Speed vac“ gefriergetrocknet.

10 Die so erhaltenen Fraktionen bzw. Prä-Elutions-Fraktionen wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und einem Western Blot unter reduzierenden Bedingungen unterzogen.

15 **Fig. 11** zeigt dasselbe Experiment wie in Fig. 10, mit der Ausnahme, daß hier nicht lysierte Endothelzellen, sondern lysierte Stroma-Zellen verwendet werden. In dem in Fig. 11 gezeigten Western-Blot zeigen die Spuren 1 - 3 die Elution von einer Affinitätssäule mit Fn-7-8-9, während die Spuren 4 - 6 die Elution von einer Affinitätssäule von Fn-7-B-8-9 zeigen. Spuren 1 und 4 sind Prä-Elutionsfaktoren, während Spuren 2, 3 bzw. 5, 6 die Fraktionen 1 und 2 des jeweiligen Elutionslaufes zeigen. Eine prominente Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 120 - 130 kDa, wie sie in Fig. 10 zu sehen ist, kann bei diesem Zell-Lysat aus 20 menschlichen Stroma-Zellen nicht festgestellt werden.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen sowie den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

25 **Fig. 12** zeigt das ED-B-Bindungsprotein, welches mittels Affinitätschromatografie, wie beschrieben, aufgereinigt und mittels SDS-Gradientengelelektrophorese (4-12%) aufgetrennt wurde. Die spezifisch angereicherten Doppel-Banden (Pfeile) wurden ausgeschnitten und mittels Massenspektroskopie analysiert.

Die Sequenzanalyse identifizierte das isolierte Protein eindeutig als das alpha2-beta1-Integrin, wobei die prädominante, schwere Bande der beta1-, die leichte Bande der alpha2-Untereinheit entspricht.

- 5 Dieser Befund spricht dafür, daß die Bindung an EDB hauptsächlich durch die beta1-Untereinheit des Integrins vermittelt wird. Entsprechend des untersuchten Zelltyps können auch andere alpa-Untereinheiten (e.g. alpha2) mit beta1 kombiniert die Bindung an EDB-FN vermitteln.

10 **Fig. 13** zeigt immunhistologisch charakterisierte humanene Tumor-Cryoschnitten, wobei bedeuten:

A: Nierenzellkarzinom, Pfeile zeigen die spezifische Färbung mittels AK AM-EDBr-2

B: Close-up des selben Präparates

C: Hepatozelluläres Karzinom

15 D: Melanom (hier wurde keine spezifische Färbung gefunden)



Analyse des EDB-Rezeptors

Die Banden wurden aus einem 1D-Gel ausgeschnitten, mit NH_4HCO_3 -Lösung und Acetonitril gewaschen, getrocknet und mit Trypsinlösung zur Proteolyse der Proteine im Gel versetzt. Die aus dem Gel in die Verdauungslösung eluierten Peptide wurden über μC_{18} -Säulen aufkonzentriert und entsalzt und mit MALDI-Massenspektrometrie vermessen (= Liste von Peptidmassen des verdauten Proteins).

Mit den gefundenen Peptidmassen aus jeder Gelbande wurde eine Datenbanksuche durchgeführt. Bei nicht eindeutigen Suchergebnissen wurden zusätzlich MALDI-PSD-Spektren (Fragmentspektren) eines einzelnen Peptids vermessen. Die Spektren wurden entweder direkt zur Bestätigung einer vermuteten Peptidsequenz verwendet (Interpretation des Spektrums) oder es wurde eine Datenbanksuche mit diesen Spektren durchgeführt.

Untersuchte Banden:

Bande A = Bande 1 aus Präparation 6
 Bande 4 aus Präparation 5
 Bande 6 aus der sauren Elution

Ergebnis: Integrin $\alpha 2$

- siehe Datenbanksuchergebnis Bande 4
- die Spektren aus Bande 1 und 6 zeigen die gleichen intensivsten Peptide
 ein PSD-Spektrum eines Peptids aus Bande 1 bestätigt eine Teilsequenz von Integrin $\alpha 2$

Bande B = Bande 2 aus Präparation 6
 Bande 5 aus Präparation 5
 Bande 7 aus der sauren Elution

Ergebnis: Integrin $\beta 1$

- siehe Datenbanksuchergebnisse Bande 5 und 7
- das Spektrum aus Bande 2 zeigt die gleichen intensivsten Peptide
- die Datenbanksuche mit einem PSD-Spektrum aus Bande 2 bestätigte Integrin $\beta 1$

BSA

- ist in allen drei Banden enthalten
- durch die Datenbanksuche mit einem PSD-Spektrum und zahlreiche Peptidmassen bestätigt

```
function expandIt(whichE1) {whichE1.style.display = (whichE1.style.display == "none")? "":"none";}
```

ProFound - Search Result Summary

Version 4.10.6

© 1997-2000 ProteoMetrics

```
A: hover { COLOR: red } function toggleIt(E1) {whichIm = event.srcElement;if (E1.style.display ==
"none"){E1.style.display = "";whichIm.src = "/prowl/minus.gif";}else{whichIm.src =
"/prowl/plus.gif";E1.style.display = "none";}} A: hover { COLOR: red }
```

Protein Candidates for search 20010208092948-0121-149234049162 [121056 sequences searched]

Ran	Probabili	Est'd	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)			%	p/	kDa
k	ty	Z						
1	1.0e+000	2.20	gil4504743 reflNP_002194.1	integrin alpha 2 precursor		19	5.2	129.28
+2	2.3e-010	-	gil628012 pir A53933	myosin I myr 4 - rat		15	9.6	116.17
		-	gil6981242 reflNP_037115.1	unconventional myosin from rat 4 for myosin I heavy chain		15	9.6	116.12
3	8.3e-011	-	gil7513010 pir T00322	hypothetical protein KIAA0542 - human		15	11.5	117.58
			gil4210973 gb AAD12058.1	(AF105016) vacuolar proton translocating ATPase 116-kDa subunit a2 isoform; V-ATPase 116-kDa isoform a2 isoform [Bos taurus]		11	5.9	97.99

5	5.4e-013	-	gi 543747 sp P36633 ABP_RAT AMILORIDE-SENSITIVE AMINE OXIDASE [COPPER-CONTAINING] PRECURSOR (DIAMINE OXIDASE) (DAO) (AMILORIDE-BINDING PROTEIN) (ABP) (HISTAMINASE)	16	6.6	85.0 0
6	4.2e-013	-	gi 7656867 ref NP_055059.1 a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	12	6.8	134. 71
7	8.6e-014	-	gi 3688530 emb CAA09465.1 (AJ011035) phospholipase C beta 2 [Rattus norvegicus]	11	5.8	134. 87
+8	6.5e-014	-	gi 4504085 ref NP_000399.1 glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	21	7.0	80.8 0
-	-	-	gi 7446012 pir G02093 glycerol-3-phosphate dehydrogenase - human	21	7.3	80.8 2
9	5.0e-014	-	gi 7513725 pir T29098 microtubule-associated protein 4, muscle- specific - mouse (fragment)	14	8.1	114. 87
10	4.7e-014	-	gi 6005970 ref NP_009078.1 zinc finger protein 175	22	9.6	81.5 9

NOTE:

1. To search again using unmatched masses, click the symbol @.

2. Highly similar protein sequences were given the same rank (IE user: click "+" to expand/contract).

Input Summary

Date & Time Thu Feb 08 08:29:55 2001 UTC (Search Time: 6.30 sec.)

Sample ID EDB Fibronectin, Bande 4

Database NCBI nr [..databases.vnr]

Taxonomy Catego- Mammalia (mammals)

ry

Prote- 80 - 135 kDa

in Mass Range

Protein pI Range 0.0 -14.0

Search for Single protein only

Digest Chemistry Trypsin

Max Missed Cut 2

Modifications +C3H5ON@C(Partial); +O@M(Partial);

Charge State MH+

Peptide Masses

(Da,Average)

Tolerance(AVG) 1.00 ppm

935.536 1007.504 1179.635 1222.729 1277.731 1307.689 1473.816 1479.833

Peptide Masses 1510.835 1553.895 1567.768 1586.801 1638.888 1707.772 1819.830

(Da,Monoisotopic) 1851.993 1915.959 1931.980 1947.990 1973.966 1993.998 2044.968

2051.077 2068.095 2095.065 2150.093 2224.097 2283.137 2344.115

2501.214 2705.123 2775.304 2872.336 2902.333 2932.502 3052.424
3280.542

Tolerance(MON) 50.00 ppm

Number of Pepti- 37

des

Proteomics' ProFound is based on [ProFound](#) at [The Rockefeller University](#) [search + transmission time: >=6.33 sec]

```
function expandIt(whichE1) {whichE1.style.display = (whichE1.style.display == "none")? "":"none";}
```

ProFound - Search Result Summary

Version 4.10.6

© 1997-2000 Proteomics

```
A: hover { COLOR: red } function toggleIt(E1) {whichIm = event.srcElement;if (E1.style.display == "none"){E1.style.display = "";whichIm.src = "/prowl/minus.gif";}else{whichIm.src = "/prowl/plus.gif";E1.style.display = "none";}} A: hover { COLOR: red }
```

Protein Candidates for search 20010207110038-0035-149234049162 [121056 sequences searched]

Ran	Probabili	Est'd	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)			%	p/	kDa
k	ty	Z						
			gi 124963 sp P05556 ITB1_HUMAN FIBRONECTIN RECEPTOR					
+1	1.0e+000	1.15	BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) (CD29)			<u>17</u>	5.3	88.4
			(INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT)					
	-	-	gi 762977 emb CAA33272.1 (X15202) Fn receptor beta prechain [Mus musculus]			<u>11</u>	5.8	88.1
								8
	-	-	gi 72070 pir JMSFB fibronectin receptor beta chain precursor - mouse			<u>11</u>	5.8	88.3
								1
	-	-	gi 8393636 ref NP_058718.1 integrin, beta 1			<u>11</u>	5.8	88.4
								8
	-	-	gi 124964 sp P09055 ITB1_MOUSE FIBRONECTIN RECEPTOR			<u>11</u>	5.7	88.2
			BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1)					1
	-	-	gi 10336839 gb AAG16767.1 AF192528_1 (AF192528) integrin beta-1 subunit [Sus scrofa]			<u>11</u>	5.3	88.2
								5
	-	-	gi 1708573 sp P53712 ITB1_BOVIN FIBRONECTIN RECEPTOR				5.3	85.3
			BETA SUBUNIT (INTEGRIN BETA-1) (CD29) (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT)			<u>9</u>		1
	-	-	gi 1708574 sp P53713 ITB1_FELCA FIBRONECTIN RECEPTOR				5.2	88.0
			BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) (CD29)			<u>9</u>		8
			(INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT)					
2	1.9e-004	-	gi 5453910 ref NP_006216.1 phospholipase C, delta 1			<u>8</u>	6.2	85.7
								5
+3	7.7e-005	-	gi 1589134 prf 2210313A phosphatidylinositol 3-			<u>10</u>	5.9	83.4

			kinase:SUBUNIT=55kD regulatory [Rattus norvegicus]			6
			gi 6981358 ref NP_037137.1 phosphoinositide 3-kinase p85 (other			83.5
			splicing variants: p55 and p50)	8	5.9	1
			gi 1163174 gb AAA85505.1 (U32575) similar to yeast Sec6p, Swiss-			
4	1.8e-005	-	Prot Accession Number P32844; similar to mammalian B94, Swiss-Prot	8	5.8	86.4
			Accession Number Q03169; Method: conceptual translation supplied			8
			by author [Rattus norvegicus]			
5	1.1e-005	-	gi 2137061 pir PC4183 1-phosphatidylinositol phosphodiesterase (EC	10	5.9	84.6
			3.1.4.10) delta 1 - Chinese hamster (fragment)			2
6	6.1e-006	-	gi 9910238 ref NP_064388.1 general control of amino acid synthesis,	10	9.6	93.3
			yeast homolog-like 2			7
7	2.4e-006	-	gi 10047327 dbj BAB13451.1 (AB046845) KIAA1625 protein [Homo	6	9.0	97.2
			sapiens]			0
8	1.1e-006	-	gi 5032191 ref NP_005793.1 tumor protein p53-binding protein	10	9.7	93.4
						8
+9	9.9e-007	-	gi 9910260 ref NP_064581.1 HCNP protein	9	8.7	98.8
						6
		-	gi 6330235 dbj BAA86491.1 (AB033003) KIAA1177 protein [Homo	6	5.6	87.8
			sapiens]			0
			gi 9453796 emb CAB99365.1 (AL117378) dJ131F15.2 (phospho-			
+10	9.6e-007	-	diesterase I/nucleotide pyrophosphatase 1 (homologous to mouse Ly-	11	6.8	96.8
			41 antigen) (PC1, NPPS)) [Homo sapiens]			3
			gi 129678 sp P22413 PC1_HUMAN PLASMA-CELL MEMBRANE			
		-	GLYCOPROTEIN PC-1 [INCLUDES: ALKALINE			
			PHOSPHODIESTERASE I ; NUCLEOTIDE PYROPHOSPHATASE	7	6.8	99.9
			(NPPASE)]			1

NOTE:

1. To search again using unmatched masses, click the symbol @.
2. Highly similar protein sequences were given the same rank (IE user: click "+" to expand/contract).

Input Summary

Date & Time Wed Feb 07 10:00:44 2001 UTC (Search Time: 5.91 sec.)

Sample ID EDB Fibronektin, #0824, Bande 5

Database NCBI[nr [...databases\nr]

Taxonomy Catego- Mammalia (mammals)

ry

Prote- 80 - 100 kDa

in Mass Range

Protein pI Range 0.0 -14.0

Search for Single protein only

Digest Chemistry Trypsin

Max Missed Cut 2

Modifications +C3H5ON@C(Partial); +O@M(Partial);

Charge State MH+

Peptide Masses

(Da,Average)

Tolerance(AVG) 1.00 ppm

881.288 927.495 983.498 1007.525 1222.666 1376.820 1422.642 1439.854

Peptide Masses 1475.797 1479.791 1553.852 1567.742 1638.888 1781.886 1915.892

(Da,Monoisotopic) 1961.078 2019.135 2044.949 2225.083 2283.131 2470.203 3143.411

3299.415 3323.912 3337.675

Tolerance(MON) 50.00 ppm

Number of Pepti- 25

des

ProteoMetrics' ProFound is based on [ProFound](#) at [The Rockefeller University](#). [search + transmission time: >=5.94 sec]

```
function expandIt(whichE1) {whichE1.style.display = (whichE1.style.display == "none")? "":"none";}
```

ProFound - Search Result Summary

Version 4.10.6

© 1997-2000 ProteoMetrics

A: hover { COLOR: red } function toggleIt(E1) {whichIm = event.srcElement;if (E1.style.display ==

"none"){E1.style.display = "";whichIm.src = "/prowl/minus.gif";}else{whichIm.src =

"/prowl/plus.gif";E1.style.display = "none";}} A: hover { COLOR: red }

Protein Candidates for search 20010207110746-00D6-149234049162 [121056 sequences searched]

R

a

n_Probability

Est'd

Z

Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)

%

pI

kDa

k

+		gil124963 sp P05556 ITB1_HUMAN FIBRONECTIN RECEPTOR			
11.0e+000	1.61	BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) (CD29)	<u>18</u>	5.3	88.4
		(INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT)			5
-	-	gil10336839 qb AAG16767.1 AF192528_1 (AF192528) integrin beta-1	<u>12</u>	5.3	88.2
		subunit [Sus scrofa]			5
-	-	gil762977 emb CAA33272.1 (X15202) Fn receptor beta prechain [Mus	<u>12</u>	5.8	88.1
		musculus]			8
-	-	gil72070 pir IJMSFB fibronectin receptor beta chain precursor - mouse	<u>12</u>	5.8	88.3
					1

-	-	gil124964 sp P09055 ITB1_MOUSE FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1)	12	5.7	88.2 1
-	-	gil8393636 ref NP_058718.1 integrin, beta 1	12	5.8	88.4 8
-	-	gil1708573 sp P53712 ITB1_BOVIN FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT (INTEGRIN BETA-1) (CD29) (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT)	10	5.3	85.3 1
-	-	gil1708574 sp P53713 ITB1_FELCA FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1) (CD29) (INTEGRIN VLA-4 BETA SUBUNIT)	11	5.2	88.0 8
23.1e-006	-	gil479805 pir S35458 SNF2 protein homolog - human (fragment)	12	7.0	88.5 9
+					
37.7e-007	-	gil5725250 emb CAB52406.1 (AJ245661) G7 protein [Homo sapiens]	8	5.9	94.6 5
-	-	gil3108220 gb AAC62533.1 (AF048986) MutS homolog 5 [Homo sapiens]	8	6.0	92.8 7
-	-	gil4505253 ref NP_002432.1 mutS (E. coli) homolog 5	8	6.0	92.8 6
46.7e-007	-	gil7512247 pir 65253 disintegrin-like testicular metalloproteinase (EC 3.4.24.-) IVb - crab-eating macaque (fragment)	14	6.6	80.8 2
51.8e-007	-	gil10438454 dbj BAB15248.1 (AK025824) unnamed protein product [Homo sapiens]	19	6.4	80.6 0
65.4e-008	-	gil1586344 prf 2203411A reeler gene [Mus musculus]	10	5.7	99.3 7
73.0e-008	-	gil4503165 ref NP_003581.1 cullin 3	16	9.0	88.9 1
+					
81.4e-008	-	gil6681275 ref NP_031934.1 eukaryotic elongation factor-2 kinase	14	5.2	81.7 2
-	-	gil6978795 ref NP_037079.1 eukaryotic elongation factor 2 kinase	9	5.1	81.4 7
91.2e-008	-	gil7662434 ref NP_055733.1 KIAA0990 protein	15	9.5	91.7 1
5.2e-009	-	gil7662436 ref NP_055749.1 KIAA0996 protein	13	5.8	96.6

1

0

NOTE:

1. To search again using unmatched masses, click the symbol @.
2. Highly similar protein sequences were given the same rank (IE user: click "+" to expand/contract).

Input Summary

Date & Time Wed Feb 07 10:07:52 2001 UTC (Search Time: 5.88 sec.)

Sample ID EDB Fibronectin, #0824, Bande 7

Database NCBI/nr [..\databases\nr]

Taxonomy Catego- Mammalia (mammals)

ry

Prote- 80 - 100 kDa

in Mass Range

Protein pI Range 0.0 -14.0

Search for Single protein only

Digest Chemistry Trypsin

Max Missed Cut 2

Modifications +C3H5ON@C(Partial); +O@M(Partial);

Charge State MH+

Peptide Masses

(Da,Average)

Tolerance(AVG) 1.00 ppm

881.213 983.479 1222.615 1266.561 1376.698 1422.672 1473.821 1479.786

Peptide Masses

(Da,Monoisotopic)

1553.850 1567.725 1639.856 1781.886 1819.830 1915.945 1931.961

1961.051 2019.150 2068.101 2224.061 2283.101 2344.093 2470.201

2501.215 2705.264 2776.358 2840.545 2872.558 3052.493 3143.494

3159.559 3280.571 3298.572

Tolerance(MON) 50.00 ppm

Number of Pepti- 32

des

- 5 ProteoMetrics' ProFound is based on [ProFound](#) at [The Rockefeller University](#) [search + transmission time: >=5.91 sec]

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Schering AG

5 <120> Rezeptor der ED_B-Fibronektin-Domäne

<130> s5495

<140>

10 <141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Bindungssequenz Nr. I für den putativen EDB-Rezeptor auf dem EDB-Molekül

20

<400> 1

Val Asp Ile Thr Asp Ser Ser Ile Gly Leu Arg Trp Thr Pro Leu

1

5

10

15

25

<210> 2

<211> 15

30 <212> PRT

<213> Bindungssequenz Nr. II für den putativen EDB-Rezeptor auf dem EDB-Molekül

<400> 2

Gly Tyr Tyr Thr Val Thr Gly Leu Glu Pro Gly Ile Asp Tyr Asp

1 5 10 15

5

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Bindungssequenz Nr. III für den putativen EDB-Rezeptor auf dem EDB-

10 Molekül

<400> 3

Thr Gly Leu Glu Pro Gly Ile Asp Tyr Asp Ile Ser Val Ile Thr

1 5 10 15

15

<210> 4

<211> 91

<212> PRT

<213> homo sapiens

20

<400> 4

Glu Val Pro Gln Leu Thr Asp Leu Ser Phe Val Asp Ile Thr Asp Ser

1 5 10 15

25

Ser Ile Gly Leu Arg Trp Thr Pro Leu Asn Ser Ser Thr Ile Ile Gly

20 25 30

30

Tyr Arg Ile Thr Val Val Ala Ala Gly Glu Gly Ile Pro Ile Phe Glu

35 40 45

Asp Phe Val Asp Ser Ser Val Gly Tyr Tyr Thr Val Thr Gly Leu Glu

50 55 60

Pro Gly Ile Asp Tyr Asp Ile Ser Val Ile Thr Leu Ile Asn Gly Gly

65

70

75

80

5 Glu Ser Ala Pro Thr Thr Leu Thr Gln Gln Thr

85

90